



УДК 577.152.277*7.042

ДНК-ПОЛИМЕРАЗА α ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА.
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ОЛИГОТИМИДИЛАТОВ
РАЗЛИЧНОЙ ДЛИНЫ С УЧАСТКОМ СВЯЗЫВАНИЯ МАТРИЦЫ

Невинский Г. А., Подуст В. Н., Левина А. С.,
Халабуда О. В., Лазрик О. И.

Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Исследована модификация ДНК-полимеразы α плаценты человека $d(pT)_2pC \cdot [Pt^{2+}(NH_3)_2OH](pT)_7$. Модификация фермента этим реагентом описывается линейной зависимостью логарифма активности фермента от времени, что указывает на псевдопервый порядок реакции модификации. Оценена величина K_d (0,5 мкМ) диссоциации обратимого комплекса фермента с аффинным модификатором. Исходный декануклеотид $d(pT)_2pC(pT)_7$ (K_d 0,15 мкМ), а также олигонуклеотиды $d(Tr)_9T$ (K_d 0,15 мкМ) и $[d(Tr)_9]ddT$ (K_d 0,15 мкМ) с одинаковой эффективностью защищают фермент от инактивации реагентом. Защитный эффект олиготимидилатов $d(Tr)_nT$, где n изменяется от 3 до 14, существенно зависит от их длины. Величины K_d комплексов фермента с этими олигонуклеотидами, найденные с помощью защитных эффектов, изменяются согласно убывающей геометрической прогрессии от 5,3 до 0,0091 мкМ, так что с увеличением длины олиготимидилатов на одно звено их сродство к участку связывания матрицы на полимеразе возрастает приблизительно в 1,71 раза. Это соответствует изменению свободной энергии Гиббса на 0,32 ккал/моль. На основании этого сделано предположение, что при образовании комплекса полимеразы с $d(Tr)_{14}T$ мономерные звенья пентадекатимидилата, начиная по крайней мере с третьего нуклеотида с 3'-конца, не образуют с ферментом ни водородных связей, ни электростатических контактов. Показано, что величины K_d для матриц достаточно хорошо отражают истинное сродство (K_d) матриц к ферменту. Добавление комплементарного матрице праймера увеличивает ее сродство к ферменту, однако соотношение между сродством двух олигонуклеотидов равной длины к участку связывания матрицы на ферменте в присутствии и в отсутствие комплементарной им цепи является величиной постоянной.

До настоящего времени для исследования участков связывания матриц ДНК-зависимых полимераз (КФ 2.7.7.7) в основном использовались методы центрифугирования комплексов ферментов с различными ДНК в градиентах плотности сахарозы или глицерина [1–3] и ингибиторный анализ модифицированных ДНК в реакции полимеризации [1–4]. Исследования первого рода носят в основном качественный характер. Интерпретация результатов ингибиторного анализа не всегда однозначна ввиду сложности анализируемой системы.

Одним из наиболее информативных методов исследования ферментов в настоящее время является метод аффинной модификации биополимеров [5]. С помощью этого метода количественные характеристики комплексообразования ферментов с различными лигандами могут быть получены из зависимостей скоростей инактивации ферментов от концентрации аффинных реагентов и конкурентных им лигандов [5, 6]. Он выглядит особенно перспективным, поскольку необходимые данные извлекаются из инактивации специфической ферментативной реакции, что в большинстве случаев не требует больших количеств и гомогенности используемых препаратов ферментов. Однако нам неизвестны примеры использования аффинных реагентов — аналогов матриц для исследования

Сокращения: TPS — 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид, ClPh — *n*-хлорфенил, Lev — левузинил, CNEt — диэтил, NEPEs — 2-N-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфокислота, BSA — бычий сывороточный альбумин, реагент M — $d(pT)_2pC \cdot [Pt^{2+}(NH_3)_2OH](pT)_7$.

Схема очистки ДНК-полимеразы α из плаценты человека *

Стадия очистки	Концентрация белка, мг/мл	Общий белок, мг	Удельная активность, ед. акт./мг	Суммарная активность, 10^3 ед. акт.	Выход, %	Степень очистки
Исходный гомогенат плаценты	30	$5,1 \cdot 10^4$	0,39	20	100	1
Хроматография на фосфоцеллюлозе	3,6	530	34	18	90	87
на DEAE-целлюлозе	5,7	100	140	14	70	360
на голубой сефарозе	0,15	18	560	10	50	1400

* Для очистки использовали 0,6 кг плаценты; приведены усредненные данные четырех выделений.

ДНК-полимераз. В данной работе сделана попытка создания таких аффинных реагентов.

В качестве объекта исследования нами была выбрана ДНК-полимераза α из плаценты человека. Указание на возможность выделения этого фермента есть в работе [7], однако методика его выделения не опубликована. Нами был разработан метод выделения ДНК-полимеразы α из плаценты человека (см. табл. 1). В результате получены препараты фермента, обогащенного по удельной активности в 1400 раз, с выходом 50%.

В клетках высших эукариот обнаружено три вида ДНК-полимераз: α , β и γ [7]. Указанные полимеразы имеют различные физико-химические и энзимологические характеристики. На основании анализа целого ряда стандартных параметров (см. «Экспериментальную часть») мы сделали вывод о том, что выделенный нами фермент является ДНК-полимеразой α .

Так, значения концентрации KCl, при которых выделенный фермент элюируется в виде одного пика с DEAE- и фосфоцеллюлозы (0,15 и 0,26 М), совпали с таковыми для ДНК-полимеразы α из лимфобластоидных клеток — 0,15 и 0,29 М [8].

Найденный для фермента коэффициент седиментации 7,3S соответствует характеристикам ДНК-полимераз α из различных эукариот [9], в частности ферментов из лимфобластоидных клеток человека (7,2–7,4S) [8], KB-клеток человека (7S) [10] и клеток HeLa (7S) [11]. Как и в случае ДНК-полимеразы α из KB-клеток, полученной в гомогенном состоянии [10], коэффициент седиментации выделенного нами фермента не зависит от концентрации соли. Коэффициенты седиментаций 3,3–3,7S и 6,1–6,3S, соответствующие β - и γ -полимеразам лимфобластоидных клеток человека, не согласуются с полученной нами величиной 7,3S.

Инактивация выделенного нами фермента N-этилмалеимидом согласуется с данными о чувствительности к нему ДНК-полимераз α из других высших эукариот [7, 9] и может указывать на отсутствие заметных примесей (более 1–5% по активности) ДНК-полимеразы β , поскольку последний фермент в большинстве случаев в указанных условиях вообще не инактивируется N-этилмалеимидом или же теряет не более 10–30% активности [7, 9].

Об этом же свидетельствует ингибирование фермента 0,2 М KCl: другие ДНК-полимеразы α ведут себя подобным же образом [7, 9, 12], тогда как ДНК-полимеразы β и γ не только не ингибируются 0,2 М KCl, но даже активируются при этом в 2–4 раза [7, 9].

Оптимум pH в реакции полимеризации на активированной ДНК оказался 7,4–8,5, что также согласуется с данными о величинах pH, при которых в аналогичных условиях проявляют максимальную активность.

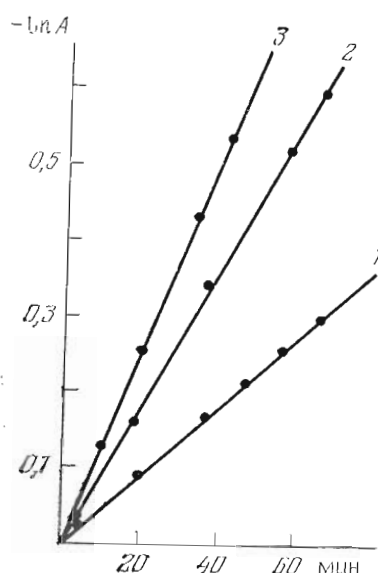


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость логарифма активности ДНК-полимеразы от времени при инкубации фермента с реагентом М в концентрации 0,28 (1), 1,7 (2), 10 мкМ (3). Активность фермента (А) в начальный момент времени принимали за единицу. Условия см. «Экспериментальную часть»

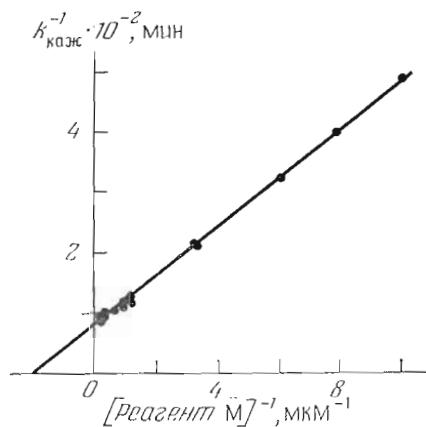


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость величины $k_{\text{акт}}$ реакции инактивации ДНК-полимеразы от концентрации реагента М в обратных координатах. Условия см. «Экспериментальную часть»

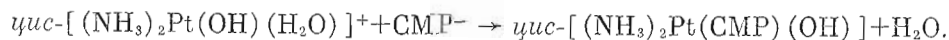
ДНК-полимеразы α из других источников [9]. Оптимумы pH ДНК-полимераз β и γ , обнаруживаемых в клетках эукариот, находятся в диапазоне 8–9 [9].

Найденная концентрация MgCl_2 (2–4 мМ), при которой фермент проявлял максимальную активность, также соответствует литературным данным [9] для ДНК-полимераз α . Оптимальные концентрации MgCl_2 для ДНК-полимераз β и γ из эукариот обычно составляют 5–25 мМ [9].

Выделенный фермент проявлял максимальную активность, как и ряд других ДНК-полимераз α [7–9, 12, 13], при использовании в качестве матрично-затравочных комплексов не гомополимерных дуплексов — $\text{poly(dA)} \cdot \text{oligo(dT)}$, $\text{poly(dT)} \cdot \text{oligo(dA)}$ или денатурированной ДНК, а ДНК, активированной панкреатической ДНКазой I. Оптимальный уровень активации ДНК составил 25–40%, что сравнимо с ДНК-полимеразой α из тимуса теленка [13]. Фермент проявлял активность на матрице poly(dT) с использованием праймера (рА)₇. Сравнение субстратной специфичности полученного нами фермента с другими ДНК-полимеразами эукариот — β и γ [9], в частности с такими ферментами из лимфобластоидных клеток [8], указывает на отсутствие заметных количеств их примесей в препаратах белка.

Совокупность полученных характеристик ДНК-полимеразы из плаценты человека свидетельствует о том, что фермент представляет собой ДНК-полимеразу α , и об отсутствии в его препаратах других матрично-зависимых полимеризующих белков.

В качестве аффинного реагента (реагент М) для ДНК-полимеразы α был использован декапуклеотид $\text{d(pT)}_2\text{pC(pT)}_7$, обработанный *цис*-аквадигидроксидиаминоплатиной(II) (Pt^{2+} -реагент), которая при pH, близких к 7, реагирует по N3 остатков цитозина [14–16] по уравнению



Тиминовые основания практически не взаимодействуют с Pt^{2+} -реагентом, а гидроксильная группа замещается значительно труднее, чем молекула H_2O [14].

Показано, что инкубация $d(pT)_2pC(pT)_7$ с 10-кратным избытком Pt^{2+} -реагента ($30^\circ C$, 1 сут) приводит к превращению олигонуклеотида на 97–99% в целевой продукт с зарядом, на единицу меньшим, чем у исходного декануклеотида.

Инкубация ДНК-полимеразы с реагентом М вызывала инактивацию фермента, определяемую с помощью реакции полимеризации на активированной ДНК. Препараты фермента не были гомогенными, а лишь обогащенными по ДНК-полимеразе α , поэтому не была исключена возможность заметного расхода реагента на реакции с балластными белками. Однако кривые зависимости логарифма остаточной активности фермента от времени его инкубации с реагентом линейны в интервале до 1 ч (рис. 1). Это указывало на отсутствие заметного расхода реагента на реакции с другими белками и добавленными низкомолекулярными лигандами и позволяло оценивать кажущиеся константы скоростей инактивации фермента ($k_{\text{каж}}$) при фиксированных концентрациях реагента. С помощью кривой зависимости величины $k_{\text{каж}}$ инактивации полимеразы от концентрации реагента М в обратных координатах (рис. 2) величина K_d комплекса фермента с аналогом декануклеотида была оценена как 0,5 мкМ, а константы скорости инактивации полимеразы реагентом М — как $1,2 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$. Линейная зависимость логарифма активности фермента от времени инкубации с реагентом М указывает на псевдопервый порядок реакции модификации полимеразы Pt^{2+} -содержащим декануклеотидом.

По-видимому, отсутствие заметного расхода реагента М на побочные реакции в нашем случае связано с относительно быстрым протеканием основной реакции, обусловленным образованием достаточно стабильных специфических комплексов реагента с ферментом и ускорением реакции за счет повышения эффективной концентрации акцептора химически активной группы реагента [5]. В случае Pt^{2+} -реагентов не исключено также дополнительное ускорение реакции в результате переноса протона с нуклеофильных групп биополимера на гидроксильную группу реагента [17].

ДНК-полимеразы имеют два участка, способные связывать полинуклеотиды: участки связывания праймера и матрицы. В работе [2] определен порядок связывания лигандов с ДНК-полимеразой α из KB-клеток. Показано, что сначала ДНК-полимераза связывает одноцепочечную нуклеиновую кислоту (матрицу) и только после этого она способна (потенциально) узнать и связать праймер. Связывание затравки является необходимым условием для последующего кинетически значимого связывания dNTP. Известно также, что при добавлении праймера, некомплементарного матрице, реакция полимеризации не протекает. Нами было показано, что ДНК-полимераза α из плаценты человека связывает декануклеотиды, содержащие в своем составе одно основание, некомплементарное матрице, с меньшей эффективностью, чем полностью комплементарный матрице декануклеотид. Например, $d(pT)_4pC(pT)_5$ связывается с ферментом с такой же эффективностью, как и $d(pT)_5$ (данные не приведены). Эти результаты указывают на то, что связывание праймера с полимеразой зависит от матрицы и происходит за счет образования уотсон-криковских водородных связей праймера с цепью матрицы. Очевидно, что если одноцепочечный олиго- или полинуклеотид эффективно связывается с ДНК-полимеразами, то при этом происходит образование комплекса только с матричным участком фермента. Следует также отметить высказанное ранее [1] предположение о том, что для образования комплексов нуклеозидов или нуклеозид-5'-фосфатов с участком связывания праймера в случае ДНК-полимеразы I из *E. coli* необходимо наличие у лиганда 3'-концевой гидроксильной группы. В работах [2–4] показано, что молекулы ДНК, фосфорилированные по 3'-концевой гидроксильной группе, связываются с ДНК-полимеразой α из KB-клеток с меньшей эффективностью (~4 раза), чем ДНК, не содержащие 3'-концевой фосфат. Молекулы типа $(dA)_{100}-(dT)_{25}-ddT$ конкурируют с молекулами, содержащими на 3'-конце дезокситимидин, проявляя по сравнению с последними более

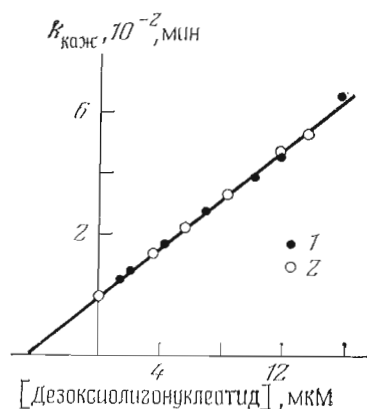


Рис. 3

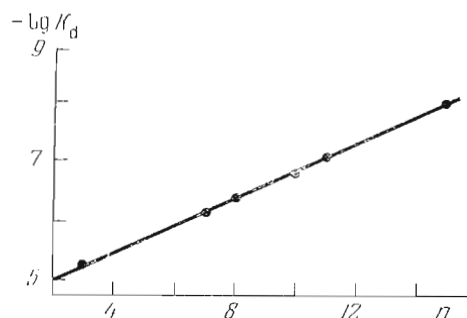


Рис. 4

Рис. 3. Зависимости величин $k_{\text{кат}}$ реакции инаktivации ДНК-полимеразы от концентрации $[d(\text{Tr})_9]\text{ddT}$ (1) и $d(\text{pT})_2\text{pC}(\text{pT})_7$ (2) при фиксированной концентрации реагента М (1 мкМ)

Рис. 4. Зависимость величин логарифмов K_d комплексов олиготимидилатов с ДНК-полимеразой от числа нуклеотидных звеньев в олигонуклеотиде

высокое сродство (в 5–20 раз). Авторы работ [2–4] объясняют это непродуктивным связыванием ddT-содержащих молекул.

Нам было показано, что олигонуклеотиды $d(\text{pT})_2\text{pC}(\text{pT})_7$, $d(\text{Tr})_9\text{T}$ и $[d(\text{Tr})_9]\text{ddT}$ (последний содержит на 3'-конце 2',3'-дидезокситимидин) практически одинаково защищают полимеразу от инаktivации реагентом. Определение величин K_d комплексов этих нуклеотидов с ферментом было проведено с помощью изучения зависимостей $k_{\text{кат}}$ инаktivации полимеразы от их концентрации при фиксированных концентрациях химически активного реагента (рис. 3). Величины K_d для всех трех олигонуклеотидов оказались равными 0,15 мкМ (табл. 2). Эти величины в ~3 раза меньше величины K_d (0,5 мкМ) для реагента М. Следовательно, введение Pt^{2+} -содержащей группы по остатку цитозина не влияет существенно на сродство декануклеотида $d(\text{pT})_2\text{pC}(\text{pT})_7$ к ферменту. Введение в декатимидилат коццевого остатка дидезокситимидина не изменяет сродства $[d(\text{Tr})_9]\text{ddT}$ к ферменту по сравнению с $d(\text{Tr})_9\text{T}$, как это наблюдается при описанных выше различных модификациях концевой 3'-ОН-группы. Величина K_m (1,4 мкМ) для $d(\text{pT})_2\text{pC}(\text{pT})_7$ в качестве праймера [матрица – $\text{poly}(\text{dA})$] на порядок больше величины K_d (0,15 мкМ) для этого нуклеотида, найденной с помощью аффинного реагента. Эти данные в совокупности с приведенными выше литературными данными о порядке связывания лигандов ДНК-полимеразой α , а также с приведенными ниже результатами по сравнению эффективности связывания матриц и праймеров с помощью аффинного реагента и реакции полимеризации свиде-

Таблица 2

Величины констант диссоциации (K_d) комплексов ДНК-полимеразы из плаценты человека с олигонуклеотидами различной длины *

Олигонуклеотид	K_d , мкМ	Олигонуклеотид	K_d , мкМ
$d(\text{pT})_3$	5,3	$d(\text{Tr})_9\text{T}$	0,15
$d(\text{pT})_7$	0,73	$[d(\text{Tr})_9]\text{ddT}$	0,15
$d(\text{Tr})_7\text{T}$	0,40	$d(\text{pT})_2\text{pC}(\text{pT})_7$	0,15
$d(\text{Tr})_{10}\text{T}$	0,077	$d(\text{pT})_2\text{pC}(\text{Pt}^{2+})(\text{pT})_7$	0,50
$d(\text{Tr})_{14}\text{T}$	0,0091		

* Ошибка в определении величин K_d не превышала 15–30%.

Величины K_d комплексов дезоксиолиготимидилатов и олигоаденилатов с ДНК-полимеразой и K_m нуклеотидов в реакции полимеризации *

Олигонуклеотид	Комплементарный олигонуклеотид, добавленный в фиксированной концентрации	Матрица		Праймер	
		K_d	K_m	K_d	K_m
		мкМ			
$d(pT)_2pC(Pt^{2+})(pT)_7$	$(pA)_5$	0,041	—	—	—
$d(Tr)_9T$	$(pA)_5$	—	0,060	—	—
	$(pA)_7$	—	0,028	—	—
$d(Tr)_{14}T$	$(pA)_7$	—	0,0017	—	—
$(pA)_5$	Реагент М	—	—	25,0	—
	$d(Tr)_9T$	—	—	—	61,0
	poly(dT)	—	—	—	58,0

* Величины констант диссоциации лигандов определены с помощью модификации ДНК-полимеразы $d(pT)_2pC[Pt^{2+}(NH_3)_2OH](pT)_7$ (реагент М), а величины K_m — с помощью реакции полимеризации, катализируемой ДНК-полимеразой; ошибка в определении констант не превышала 20—30%.

тельствуют о связывании одноцепочечных олигонуклеотидов с матричным участком фермента.

В настоящее время в литературе, по-видимому, отсутствуют данные о минимальном олигонуклеотиде, способном связываться с матричным участком на полимеразах. Нет также данных о природе взаимодействия — типе связей, образуемых матрицей с ферментом. Мы попытались оценить сродство олиготимидилатов разной длины к участку связывания матрицы на ДНК-полимеразе. Для этого была определена эффективность защитного действия некоторых олиготимидилатов, содержащих от 3 до 15 мономерных звеньев, при инактивации фермента реагентом М. Найденные величины K_d приведены в табл. 2 и на рис. 4.

Видно, что сродство олиготимидилатов к полимеразе не зависит от наличия или отсутствия 5'-фосфатной группы на 5'-концевом нуклеотиде олиготимидилатов. Приведенные данные позволяют предполагать, что минимальный нуклеотид, способный связываться с матричным участком, может быть довольно коротким (возможно, даже мононуклеотид). Представленная на рис. 4 зависимость линейна, причем увеличение длины олигонуклеотида на одно мономерное звено приводит к возрастанию сродства к ферменту в 1,71 раза. Иными словами, величины K_d комплексов олигонуклеотидов с матричным участком фермента изменяются в соответствии с убывающей геометрической прогрессией: $0,6 \cdot 10^{-5} \cdot (0,583)^{n-3}$ М, где $0,6 \cdot 10^{-5}$ М — величина K_d для $d(pT)_3$, а n — число мономерных звеньев в олиготимидилате.

С возрастанием длины олигонуклеотида на мономерную единицу величина логарифма K_d изменяется от 0,234. Такая разница в значении логарифма соответствует изменению свободной энергии Гиббса на 0,318 ккал/моль, что существенно меньше, чем обычно наблюдающееся при образовании электростатических контактов или водородных связей между ферментами и лигандами (2—6 ккал/моль) [18]. Таким образом, каждая из мономерных единиц пентадекатимидилата $d(Tr)_{14}T$, начиная с 3-го и до 15-го звена, по-видимому, не образует с ферментом ни водородных связей, ни электростатических контактов. По порядку величины найденное нами изменение свободной энергии Гиббса сравнимо, в случае ферментов, с таковыми величинами для ван-дер-ваальсовых и слабых гидрофобных взаимодействий [18], а также с ΔG (0,47 ккал/моль) при переносе тимина из 6 М CH_3OH в H_2O [19]. Поэтому разумно предположить, что найденное изменение свободной энергии Гиббса отражает выигрыш в энергии за счет переноса оснований мономерных звеньев олигонуклеотидов из водного окружения в гидрофобную (или гидрофильно-гидрофобную) полость фермента, связывающую матрицу. В пользу нали-

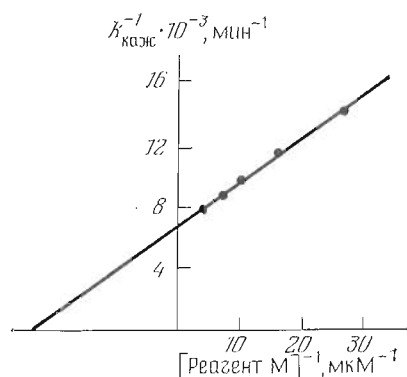


Рис. 5

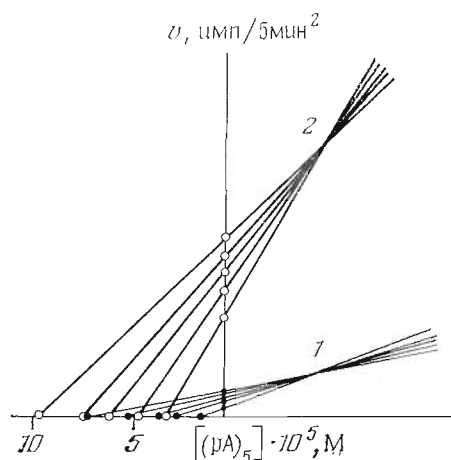


Рис. 7

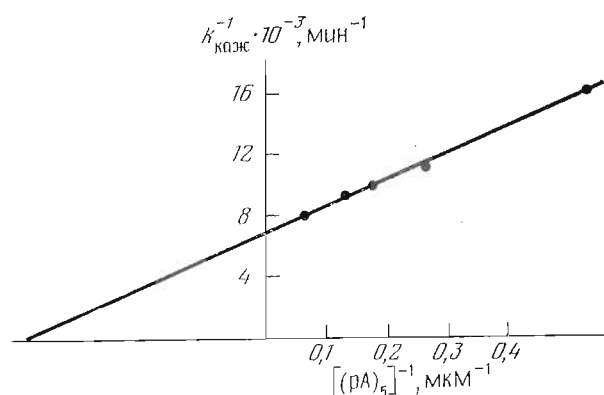


Рис. 6

Рис. 5. Зависимость величин $k_{\text{нак}}$ реакции инактивации ДНК-полимеразы от концентрации реагента M в присутствии 85 мкМ $(pA)_5$

Рис. 6. Зависимость величин $k_{\text{нак}}$ реакции инактивации ДНК-полимеразы от концентрации $(pA)_5$ в присутствии 0,097 мкМ реагента M

Рис. 7. Зависимости скорости реакции полимеризации, катализируемой ДНК-полимеразой, от концентрации $(pA)_5$ в присутствии 0,1 мкМ $d(Tr)_5T$ (1) и 0,4 ОЕ₂₆₇/мл $poly(dT)$ (2) в прямых линейных координатах Эйзенштейна и Корниш-Боудена

чия в этом участке фермента гидрофильных групп указывает сам факт модификации фермента Pt^{2+} -декануклеотидом.

Особого внимания заслуживает тот факт, что одни только гидрофобные взаимодействия олигонуклеотидов с ферментом не могут обеспечить специфичности узнавания ДНК ДНК-полимеразами. По-видимому, некоторые межнуклеотидные фосфатные группы образуют электростатические контакты с полимеразой. Однако следует еще раз подчеркнуть, что 12 и 15 мономерных звеньев пентадекатимидилата, скорее всего, таких контактов с ферментом не образуют.

Взаимодействие матрицы с ферментом должно усиливаться в присутствии комплементарной ей цепи праймера за счет образования водородных связей и фиксирования праймера на ферменте [20]. Мы оценили сродство реагента M к полимеразе в присутствии комплементарного ему пентааденилата $(pA)_5$ (рис. 5). Величина K_d комплекса декануклеотида с ферментом в этом случае оказалась равной 0,041 мкМ (табл. 3), что приблизительно в 12 раз меньше, чем K_d реагента M в отсутствие $(pA)_5$ (табл. 2). Была также оценена величина K_d для $(pA)_5$ в случае комплекса фермент-реагент $M \cdot (pA)_5$. Для этого фиксировали низкую концентрацию реагента, при которой наблюдалась небольшая инактивация фер-

мента ($\sim 7\%$), и варьировали концентрацию $(pA)_5$ (рис. 6). Величина K_d для $(pA)_5$ была найдена равной 25 мкМ.

Представлялось целесообразным сравнить полученные величины K_d для олигонуклеотидов с величинами соответствующих им K_m в реакции полимеризации, катализируемой ферментом. Величины K_m для $d(Tr)_9T$ и $d(Tr)_{14}T$ с $(pA)_7$ в качестве затравки были найдены равными соответственно 0,028 и 0,0017 мкМ (табл. 3). Величины K_m в системе $d(pT)_9T \cdot (pA)_5$ были оценены равными соответственно 0,06 и 61 мкМ (табл. 3, рис. 6 и 7). Величины K_m для $(pA)_5$, найденные при использовании в качестве матриц $d(Tr)_9T$ и $poly(dT)$, практически не различаются (рис. 7, табл. 3). В то же время, как видно из рис. 7, V_{max} превращения на матрице $poly(dT)$ примерно в 5–6 раз выше, чем на $d(Tr)_9T$.

Величины K_d для декануклеотидов $d(pT)_2pC(Pt^{2+})(pT)_7$ (реагент М) и $d(Tr)_9T$ различаются в 3,3 раза (табл. 2). Практически такое же различие в случае этих декануклеотидов наблюдается для величин K_d и K_m , определенных в присутствии $(pA)_5$ соответственно по инактивации фермента и реакции полимеризации.

Очевидно, что величины K_m для матриц, найденные с помощью реакции полимеризации, несколько завышены, но достаточно хорошо отражают истинную величину сродства (K_d) матриц к ферменту. Как видно из табл. 2, величина K_d для $d(Tr)_{14}T$ (0,009 мкМ) в 16,5 раза меньше, чем величина K_d для $d(Tr)_9T$ (0,15 мкМ). Практически так же (в 16,5 раза) различаются величины K_m для $d(Tr)_{14}T$ ($1,7 \cdot 10^{-3}$ мкМ) и $d(Tr)_9T$ (0,028 мкМ). Следовательно, соотношение между сродством двух олигонуклеотидов разной длины к участку связывания матрицы на ферменте в присутствии и в отсутствие комплементарной им цепи является величиной постоянной.

Величина K_d для $(pA)_5$ (25 мкМ), найденная по данным реакции инактивации фермента, примерно в 2,5 раза меньше, чем K_m (60 мкМ) для пентаденилата (табл. 3). По-видимому, величины K_m для праймеров ДНК-зависимых ДНК-полимераз завышены по сравнению с величинами K_d , как и в случае ряда других ферментов и соответствующих им лигандов [18].

Процесс модификации полимеразы реагентом М удовлетворяет большинству критериев аффинности модификации биополимеров [5]. Модификация ДНК-полимеразы химически реакционноспособным аналогом декануклеотида сопровождается потерей ферментативной активности, в то время как *цис*-аквагидроксидиаминоплатина(II) не инактивирует фермент. Начальная скорость модификации фермента изменяется в зависимости от начальной концентрации реагента М по гиперболическому закону, достигая предельного значения при довольно высоких концентрациях реагента. Сродство реагента к ферменту, определенное из зависимости скорости модификации от начальной концентрации реагента, сравнимо со сродством олиготимидилатов той же длины, оцененным с помощью реакции полимеризации, катализируемой ферментом. Химически неактивные олиготимидилаты защищают фермент от инактивации реагентом М, проявляя сравнимое с аналогом сродство к ферменту. Совокупность полученных данных свидетельствует в пользу модификации участка связывания матрицы у фермента.

Предложенный нами метод определения сродства олигонуклеотидов к ДНК-полимеразе с помощью Pt^{2+} -реагента представляется перспективным для исследования сродства гомо- и гетеро-, одно- и двухцепочечных нуклеиновых кислот к ДНК-полимеразам и выявления роли оснований, рибозы и межнуклеотидных фосфатов во взаимодействии ДНК с ферментами.

Экспериментальная часть

В работе использовали $(Tr)T$, $(ClPh)pT(Lev)$, $(ClPh, CNEt)pTr \cdot (ClPh)T(Lev)$, $(ClPh, CNEt)pCp(ClPh)T(Lev)$ дезоксириада, TPS отечественного производства, $dATP$, $dCTP$, $dGTP$, $dTTP$, $poly(dA)$, $poly(dT)$, ДНК молок лосося (НИКТИ БАВ, г. Бердск), БСА (Koch-Light Labora-

тогес, Англия), N-метилимидазол (Fluka, Швейцария), $MnCl_2$ (Merck, ФРГ), $[^3H]dTTP$, $[^3H]dCTP$, $[^3H]dATP$ с уд. акт. соответственно 836, 830 и 1400 ТБк/моль (Изотоп, СССР); остальные реактивы квалификации ос. ч.

Все использованные в работе олигонуклеотиды были гомогенными по данным микроколоночной ионообменной и обращенно-фазовой хроматографий, проведенных на хроматографе «Миллихром» (отечественного производства) согласно методикам, описанным в работе [20]. Олиготимидилаты $d(Tp)_7T$, $d(Tp)_9T$, $d(Tp)_{10}T$, $d(Tp)_{14}T$ получали согласно [21], используя исходные блоки дезоксириада: $(ClPh)pT(Lev)$ или $(ClPh, CNEt)pTp(ClPh)T(Lev)$ и $(Tr)T$, а в качестве конденсирующего реагента — TPS и метилимидазол. Олигонуклеотиды $d(pT)_7$ и $d(pT)_2pC(pT)_7$ синтезировали на полимере по методу [22], используя защитные дезокси-моно- и динуклеотиды $(ClPh, CNEt)pTp(ClPh)T$, $(ClPh, CNEt)pCp(ClPh)T$ и $(ClPh, CNEt)pT$. Декануклеотид $[d(Tp)_9]ddT$ также синтезирован на полимере с использованием дезоксиблоков $Tr(ClPh, CNEt)$, $Tr(ClPh) \cdot Tr(ClPh, CNEt)$ и ddT ; последний предоставлен В. В. Самуковым. Во всех описанных случаях целевые продукты выделяли с помощью ионообменной, а затем обращенно-фазовой хроматографии на хроматографе Altex (Altex, США), как описано в работе [20]. Препараты $(pA)_5$ и $(pA)_7$ были любезно предоставлены А. Г. Веняминовой (НИБХ, Новосибирск). Определение коэффициентов молярного поглощения дезоксирибоолигонуклеотидов проводили по методике, описанной в работе [20], с помощью фосфодиэстеразы змеиного яда, любезно предоставленной А. С. Буториным (НИБХ СО АН СССР).

Препарат *цис*- $[(NH_3)_2Pt(OH)(H_2O)]NO_3$ (Pt^{2+} -реагент) был получен обработкой *цис*-дихлордиамминоплатины(II) (любезно предоставлена М. Ф. Могилевкиной, НГУ, Новосибирск) азотнокислым серебром согласно [23].

Аффинный реагент M ($d(pT)_2pC[Pt^{2+}(NH_3)_2OH](pT)_7$) получали обработкой $d(pT)_2pC(pT)_7$ (25 нмоль) в течение 1 сут при $30^\circ C$ *цис*-аквагидроксидиамминоплатиной(II) (250 нмоль) в 0,1 мл 2 мМ $NEPES/KOH$, pH 7,0. Степень превращения вещества и гомогенность конечного продукта анализировали с помощью микроколоночной хроматографии на целлюлозе DE-41 в градиенте концентрации KCl , содержащем 8 М мочевины. Было показано, что исходный олигонуклеотид, элюируемый со смолы при 0,2 М KCl , за указанное время превращается на 97–99% в производное с зарядом, меньшим на единицу (0,17 М KCl). Максимум поглощения исходного декануклеотида при образовании реагента смещается от 269 и 268,3 нм, а молярный коэффициент поглощения уменьшается от $8,69 \cdot 10^4$ до $8,60 \cdot 10^4$. В ряде случаев препарат перед использованием очищали на целлюлозе DE-41 в градиенте концентрации KCl , содержащем 20% этанола, с последующим удалением KCl гель-фильтрацией на сефадексе G-25.

Кинетические параметры реакции полимеризации при $30^\circ C$ определяли следующим образом. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 50 мМ трис- HCl (pH 7,5), 0,12 мМ $MgCl_2$, 0,5 мг/мл БСА, 20 мкМ $[^3H]dATP$ с уд. акт. 83–160 ТБк/моль. При определении величин K_m для матрицы концентрации олиготимидилатов варьировали в диапазоне 0,1 нМ — 5 мкМ при фиксированных концентрациях $(pA)_5$ (120–200 мкМ) или $(pA)_7$ (70–100 мкМ). При определении величин K_m для $(pA)_5$ как праймера его концентрацию изменяли в диапазоне 2–70 мкМ, концентрации $d(Tp)_9T$ или $poly(dT)$ при этом были равными соответственно 0,1–0,2 мкМ и 0,4 ОЕ₂₆₈/мл. Реакцию начинали добавлением 1–2,5 ед. акт. ДНК-полимеразы и через 1–2 мин из реакционной смеси отбирали аликваты (5–10 мкл), которые наносили на диски из бумаги FN-16. Дальнейшую обработку дисков проводили согласно работе [20].

Величины K_m и V_{max} и ошибку в их определении оценивали с помощью графического метода прямых линейных координат согласно Эйзенталю и Корнели-Боудену [22].

Модификацию ДНК-полимеразы реагентом M проводили при $30^\circ C$. Инкубационная смесь объемом 50 мкл содержала 50 мМ трис-ацетат

(рН 7,4), 0,12 мМ MnCl_2 , 0,5 мг/мл БСА, 10–15 ед. акт. ДНК-полимеразы. Реакцию инактивации запускали добавлением реагента. При определении защитных эффектов концентрация реагента составляла 0,5 или 1,0 мкМ, а концентрацию химически неактивных тимидилатов варьировали в широком диапазоне, например от 0 до 5 и от 0 до 0,07 мкМ соответственно в случае крайних по длине $d(\text{pT})_3$ и $d(\text{Tp})_{14}\text{T}$.

Аликвоты инкубационных смесей (5–8 мкл) отбирали через 10–20 мин в течение 1–4,5 ч и вносили их в смеси для определения полимеризующей активности фермента (см. ниже). С помощью кинетических кривых включения меченых $d\text{NTP}$ в ДНК были найдены изменения активности фермента после его инкубации с аналогом. Величины $k_{\text{нак}}$ инактивации полимеразы аналогом в присутствии и в отсутствие других лигандов были найдены по методу Китса – Вилсона согласно [23]. При оценке величины K_d комплексов различных олигонуклеотидов с ферментом использовали следующие коэффициенты миллимолярного поглощения олиготимидилатов при 267 нм: $(\text{pT})_3$ 26,2, $(\text{pT})_7$ 60,5, $(\text{Tp})_7\text{T}$ 69, $(\text{Tp})_9\text{T}$ 87, $(\text{Tp})_{10}\text{T}$ 95,7, $(\text{Tp})_{14}\text{T}$ 127,2, а также олигонуклеотидов $d[(\text{Tp})_9]dd\text{T}$ 95,7 (267 нм), $d(\text{pT})_2\text{pC}(\text{pT})_7$ 86,9 (269 нм), найденные ранее [20] и в данной работе с помощью указанного выше метода.

Активность фермента в экспериментах по его инактивации и в процессе выделения (см. ниже) определяли следующим образом. Реакционная смесь объемом 50–70 мкл содержала 50 мМ трис- HCl (рН 7,5–8,0), 2 мМ MgCl_2 , 0,1–0,5 мг/мл БСА, 1 мМ 2-меркаптоэтанол, 10 мкМ EDTA, 2 ОЕ₂₆₀/мл активированной на 30–35% ДНК (активация панкреатической ДНКазой I согласно [24]), 20 мМ $d\text{ATP}$, $d\text{CTP}$, $d\text{TTP}$ и $d\text{GTP}$. Один из первых трех нуклеотидов содержал ^3H -метку с уд. акт. 5–50 ТБк/моль. При определении активности фермента в процессе выделения (см. ниже) каждый из нуклеотидов добавляли в концентрации 50 мкМ, а инкубацию проводили при 37° С. Все измерения активности проводили на линейных участках зависимостей накопления продукта от времени и концентрации фермента. Удельная активность ДНК-полимеразы была найдена равной 610 ед. акт./мг. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее включение 1 нмоль $d\text{NMP}$ за 1 ч при 37° С. Концентрацию белка в процессе его выделения определяли спектрофотометрически согласно методу [25]. В конечном препарате белка его концентрация была также оценена с помощью метода [26] с некоторыми модификациями.

Выделение фермента. Плаценту человека (не позже 1 ч после нормальных своевременных родов) измельчали на кусочки и замораживали в жидком азоте. Полученную массу хранили при –20° С не более 1–6 сут. Все процедуры выделения целевого фермента проводили при 4° С. К 0,6 кг частично оттаявшей плаценты добавляли 1,8 л буфера А (50 мМ трис- HCl (рН 7,5), 1 мМ EDTA, 1 мМ 2-меркаптоэтанол) и разрушали 10 мин с помощью ножевого гомогенизатора MPW-324 (ПНР). Полученный гомогенат медленно перемешивали в течение 1 ч и центрифугировали (1 ч, 9000 g, Beckman G-21C, США). К супернатанту добавляли 5 л буфера Б (буфер А без EDTA) и смешивали его с 1 л фосфоцеллюлозы (P-11, Whatman, Англия). Затем, после 30 мин перемешивания и декантирования, надосадочную жидкость сливали, а смолу переносили в колонку (5×60 см) и промывали 1 л буфера Б. Белок элюировали буфером В (50 мМ трис- HCl (рН 7,5), 10% глицерин, 0,3 М KCl , 1 мМ 2-меркаптоэтанол) со скоростью 115 мл/ч (объем фракций 15 мл). Фракции 54–60, проявляющие полимеразную активность, объединяли и разбавляли до 0,5 л буфером Б, смешивая с 80 мл DEAE-целлюлозы (DE-32, Whatman, Англия). После 30 мин перемешивания и декантирования надосадочную жидкость сливали, сорбент переносили в колонку (2×25 см) и промывали буфером Б до исчезновения поглощения элюата. Белок десорбировали со смолой буфером В со скоростью 70 мл/ч. Фракции 11–13 (по 6 мл), проявляющие полимеразную активность, разбавляли до 40 мл буфером В, не содержащим KCl (буфер Г), и наносили на колонку с голубой сефарозой (Blue Sepharose CL-6B, Pharmacia Chemical, Швеция), уравновешенной буфером Г. Белок элюировали линейным градиентом концентрации KCl в буфере Г (0,05–

0,7 М; 0,6 л) со скоростью 30 мл/ч. Фракции 20–29 (по 12 мл), обладающие ДНК-полимеразной активностью, объединяли и добавляли равный объем насыщенного раствора сульфата аммония в буфере Б. После формирования осадка белка в течение 10 ч при 0° С его отделяли центрифугированием в течение 1 ч при 17 000 g, суспендировали в 0,7 мл 70 мМ трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ 2-меркаптоэтанол, и смешивали с 0,3 мл глицерина. Фермент хранили при –20° С.

Свойства фермента. Чувствительность ДНК-полимеразы к N-этилмалеймиду определяли согласно работе [7] с некоторыми модификациями. Было показано, что инкубация (1 ч) при 4° С с этим реагентом в концентрации 0,2–0,3 мМ инактивирует фермент на 50%, а с 5 мМ реагентом — более чем на 95%.

Константу седиментации ДНК-полимеразы α определяли согласно [27], используя в качестве маркеров гемоглобин человека (4,1S), γ -глобулин человека (7,0S), альдолазу мышц кролика (7,3S), каталазу печени быка (11,3S). При использовании в качестве матрично-затравочного комплекса активированной ДНК был обнаружен один пик активности полимеразы с коэффициентом седиментации 7,3S. Коэффициент седиментации фермента не изменялся в отсутствие и в присутствии 0,3 М KCl.

Чувствительность ДНК-полимеразы к концентрации KCl (0–0,2 М) определяли с помощью реакции полимеризации на активированной ДНК, как описано выше. Наблюдали увеличение активности фермента на 40% при 40–50 мМ KCl. Повышение концентрации KCl до 0,2 М приводило к ингибированию фермента на 95–97%.

Авторы глубоко признательны М. Ф. Могилевкиной за препарат цис-дихлордиамминоплатины, А. Г. Веняминовой за (pA)₅ и (pA)₇, В. В. Горну за d(Tr)₉T, Е. М. Ивановой за d(Tr)₁₄T, А. В. Лебедеву за d(Tr)₃, В. В. Самукову за ddT, В. Ф. Зарытовой за полезные обсуждения, постоянный интерес и поддержку работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корнберг А. В кн.: Синтез ДНК. М.: Мир, 1977, с. 69–163.
2. Fisher P. A., Korn D. Biochemistry, 1981, v. 20, № 16, p. 4560–4569.
3. Fisher P. A., Korn D. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 21, p. 1140–1146.
4. Fisher P. A., Korn D. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 21, p. 1133–1139.
5. Аффинная модификация биополимеров/Ред. Кнорре Д. Г. Новосибирск: Наука, 1983, с. 3–6, 58–65.
6. Plapp B. V. Meth. Enzymol., 1979, v. 87, p. 469–499.
7. Dube D. K., Kunkel T. A., Seal G., Loeb L. A. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 561, № 2, p. 369–382.
8. Levis B. I., Abrell J. W., Smith R. G., Gallo R. C. Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 349, № 2, p. 148–160.
9. Hübscher U. Experientia, 1983, v. 39, № 1, p. 1–126.
10. Filpula D., Fisher P. A., Korn D. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 4, p. 2029–2040.
11. Lamothe P., Baril B., Chi A., Lee L., Baril E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 8, p. 4723–4727.
12. Yoshida S., Masaki S., Koiwai O. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 654, № 2, p. 194–200.
13. Yoshida S., Kondo T., Ando T. Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 353, № 4, p. 463–474.
14. Chu G. Y. H., Duncan R. E., Tobias R. S. Inorg. Chem., 1977, v. 16, № 10, p. 2625–2636.
15. Scovell W. M., O'Connor T. J. J. Amer. Chem. Soc., 1977, v. 99, № 1, p. 120–126.
16. Scovell W. M., Research R. S. J. Amer. Chem. Soc., 1979, v. 101, № 1, p. 174–180.
17. Власов В. В., Казаков С. А. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 4, с. 499–506.
18. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980, с. 272–291.
19. Биохимическая термодинамика/Ред. Джоунс М. М.: Мир, 1982, с. 148.
20. Левина А. С., Невинский Г. А., Лаврик О. И. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 3, с. 358–362.
21. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 516–521.
22. Бауск Е. В., Горн В. В., Лебедев А. В. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 6, с. 815–820.
23. Гринберг А. А., Стеценко А. И., Миткинова Н. Д., Тихонова Л. С. Журн. неорган. химии, 1971, т. 16, вып. 1, с. 264–270.
24. Noy G. P., Weissbach A. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 477, № 2, p. 70–83.
25. Ehreshmann B., Imbaut P., Weil J. M. Analyt. Biochem., 1973, v. 54, № 2, p. 454–560.

26. Schaffner W., Weismann C. *Analyt. Biochem.*, 1973, v. 56, № 2, p. 502-514.
 27. Martin R. G., Ames B. W. *J. Biol. Chem.*, 1961, v. 236, № 2, p. 1372-1379.

Поступила в редакцию
 10.VI.1985
 После доработки
 29.VII.1985

HUMAN PLACENTA DNA POLYMERASE α . EFFICIENCY OF THE INTERACTION BETWEEN OLIGOTHYMYDYLATES OF VARYING LENGTH AND TEMPLATE SPECIFIC SITE

NEVINSKY G. A., PODUST V. N., LEVINA A. S., KHALABUDA O. V.,
 LAVRIK O. I.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch
 of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Modification of human placenta DNA polymerase α by $(pT)_2pC[Pl^{2+}(NH_3)_2OH] \cdot (pT)_7$ was investigated. The linear time dependence of the enzyme activity logarithm suggested a pseudo-first order for modification. K_d value of enzyme-affinity reagent complex (0,5 μM) was estimated. The enzyme inactivation by the affinity reagent and protection from inactivation in the presence of oligonucleotides of varying length were used for determining K_d values of the enzyme-ligand complexes. Oligonucleotide $d(pT)_2pC(pT)_7$ (K_d 0,15 μM), $d(Tp)_9T$ (K_d 0,15 μM) and $[d(Tp)_9]ddT$ (K_d 0,15 μM) protected the enzyme from inactivation with equal efficiency. The protective action of oligothymidylates $d(Tp)_nT$ (where n changes from 3 to 14) strongly depended on the chain length, the K_d values diminishing from 5,3 to 0,0091 μM in the geometrical progression. The addition of one link to the oligothymidylate chain resulted in 1,71-fold increase in the oligonucleotide affinity for the enzyme specific site. Such a change corresponds to Gibbs energy change of about 0,32 kcal/mole. It is supposed that the monomer units of pentadecathymidylate (at least beginning with the third one) in $d(Tp)_{14}T$ -enzyme complex form neither hydrogen bonds nor electrostatic linkages with the enzyme. K_d values of oligonucleotides as templates are shown to reflect quite well the true affinity of template for the enzyme. This affinity increases in the presence of a primer. However, the ratio of the affinity for different oligonucleotides does not change in the presence or absence of a complementary primer.